

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela Académico Profesional de Ingeniería Forestal



**“MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *Guadua angustifolia* Kunth
EN JAEN, CAJAMARCA”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO FORESTAL

PRESENTADO POR LA BACHILLER:

WENDOLY JESUS OBLITAS PINEDO

Asesores

Ing. M. Sc. Segundo Tafur Santillán

Ing. M. Sc. Vitoly Becerra Montalvo

JAÉN – PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Fundada por Ley N° 14015 del 13 de Febrero de 1,962

"Norte de la Universidad Peruana"

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA FORESTAL
SECCIÓN JAÉN

Bolívar N° 1342 – Plaza de Armas – Telfs. 431907 - 431080
JAÉN – PERÚ

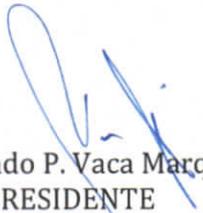


ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Jaén, a los quince días del mes de Agosto del año dos mil diecinueve, se reunieron en el Ambiente del Auditorio Auxiliar de la Universidad Nacional de Cajamarca - Sede Jaén, los miembros del Jurado designados por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 339-2019-FCA-UNC, de fecha 12 de Junio de 2019, con el objeto de evaluar la sustentación del trabajo de Tesis titulado "**MICROPROPAGACIÓN IN VITRO DE *Guadua angustifolia* Kunth EN JAÉN, CAJAMARCA**", ejecutado por la Bachiller en Ciencias Forestales Srta. **WENDOLY JESUS OBLITAS PINEDO**, para optar el Título Profesional de **INGENIERO FORESTAL**.

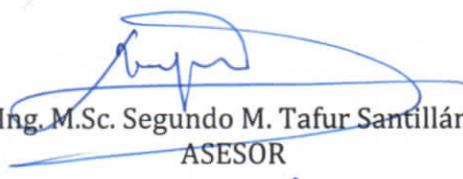
A las dieciséis horas y veintiocho minutos, de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el evento, invitando a la sustentante a exponer su trabajo de Tesis y luego de concluida la exposición, el jurado procedió a la formulación de preguntas. Terminado el acto de sustentación el Jurado procedió a deliberar, para asignarle la calificación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD** con el calificativo de **QUINCE (15)**; por tanto, la Bachiller queda expedita para que inicie los trámites, para que se le otorgue el Título Profesional de Ingeniero Forestal.

A las diecisiete horas y cuarenta y seis minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.


Dr. Segundo P. Vaca Marquina
PRESIDENTE


Ing. M.Sc. Francisco F. Aguirre de los Ríos
SECRETARIO


Ing. M.Sc. Germán Pérez Hurtado
VOCAL


Ing. M.Sc. Segundo M. Tafur Santillán
ASESOR


Ing. M.Sc. Vitoly Becerra Montalvo
ASESOR

DEDICATORIA

A Juana Isabel Pinedo Paredez, mi Madre fuente inagotable de amor, sacrificio y esperanza. A ella siempre a ella.

A Jhimy Omar Barboza Pinedo, mi hermano mayor, mi primer y gran ejemplo a seguir y que hoy desde el cielo me ha dado la fortaleza necesaria para culminar este proyecto.

Wendoly Jesus Ollitas Pinedo

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien me da la fortaleza, la salud y la esperanza para continuar cada día.

A mi madre por su apoyo incondicional, mis hermanos: Jhimy, Maribel, Diego y a mi tía Georgina, quienes me apoyaron en el proceso de la investigación.

A mis asesores: Ing. M. Sc Segundo Tafur Santillán y Ing. M. Sc. Vitoly Becerra Montalvo, por su continuo apoyo para la realización de esta investigación.

A la Cooperativa de Servicios Múltiples Sol & Café LTDA y al Ingeniero Fernando Aguirre de los Ríos, por su apoyo a este proyecto, aportando con algunos insumos y equipos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

A todos los docentes de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Forestal de la Universidad Nacional de Cajamarca sede Jaén, quienes fueron participes y forjadores de mi formación profesional.

A todas aquellas personas que de una u otra forma colaboraron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1. ANTECEDENTES	13
2.2. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE	15
2.2.1. <i>Guadua angustifolia</i> Kunth	15
2.2.2. Clasificación taxonómica	16
2.2.3. Distribución de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth	18
2.2.4. Crecimiento y desarrollo de la <i>Guadua angustifolia</i> Kunth	19
2.2.5. Usos de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth	20
2.2.6. Importancia de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth	20
2.3. MICROPROPAGACIÓN	21
2.3.1. Fases de la micropropagación	22
2.3.2. Medios de cultivo	27
2.3.3. Hormonas y reguladores de crecimiento	27
2.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN	30
2.5. COSTOS DE PRODUCCIÓN PARA BAMBÚ MICRO PROPAGADO	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO	32
3.1.1. Ubicación	32
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS	32
3.2.1. Material biológico	32
3.2.2. Reactivos	32
3.2.3. Material y equipo de laboratorio	32
3.3. METODOLOGÍA	33
3.3.1. Etapa de campo y laboratorio	34
3.3.2. Etapa final de gabinete	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. RESULTADOS DE LA FASE DE DESINFECCIÓN	40
4.2. FASE DE ESTABLECIMIENTO	42

4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN	45
4.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO	48
4.5. PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN	51
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
5.1. CONCLUSIONES	52
5.2. RECOMENDACIONES	52
VI. LITERATURA CITADA	53
ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos de desinfección aplicados	36
Tabla 2. Tratamientos para la fase de establecimiento	37
Tabla 3. Tratamientos para la fase de multiplicación	38
Tabla 4. Tratamiento para la fase de enraizamiento	39
Tabla 5. Porcentaje de explantes no contaminados	40
Tabla 6. Media por tratamiento	42
Tabla 7. Análisis de varianza de la fase de establecimiento	43
Tabla 8. Prueba de significancia TUKEY para la fase de establecimiento	43
Tabla 9. Promedio de número de brotes por tratamiento	45
Tabla 10. Análisis de varianza de la fase de multiplicación	46
Tabla 11. Prueba de significancia TUKEY de la fase de multiplicación	46
Tabla 12. Promedio de longitud de raíz mayor	48
Tabla 13. Análisis de varianza de la fase de enraizamiento	49
Tabla 14. Prueba de significancia Tukey para la fase de enraizamiento	49
Tabla 15. Procesamiento de datos de la fase de desinfección	62
Tabla 16. Datos de la fase de establecimiento	63
Tabla 17. Análisis ANVA completo de la fase de establecimiento	64
Tabla 18. Prueba de significancia TUKEY (Copenhaver - Holland 1988)	64
Tabla 19. Datos de la fase de multiplicación	65
Tabla 20. Análisis ANVA completo de la fase de multiplicación	66
Tabla 21. Prueba TUKEY (Copenhaver - Holland 1988) para la fase de multiplicación	66
Tabla 22. Datos para la fase de enraizamiento	67
Tabla 23. Análisis ANVA completo para la fase de enraizamiento	68
Tabla 24. Prueba de significancia TUKEY (Copenhaver - Holland 1988) para la fase de enraizamiento.	68

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de explantes de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth no contaminados por tratamiento	40
Gráfico 2. Promedio de crecimiento de explantes de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth por tratamiento	42
Gráfico 3. Número promedio de brotes de explantes de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth por tratamiento	45
Gráfico 4. Porcentaje de longitud de raíz mayor de explantes de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth por tratamiento	48

RESUMEN

La presente investigación se basó en definir las mejores condiciones del cultivo *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth para sistematizar la micropropagación masiva de los mejores ejemplares y como resultado final se definió un protocolo de micropropagación.

Las muestras (chusquines), fueron cultivadas en vivero para finalmente extraer segmentos nodales con una yema para proceder a micropropagarlas. La micropropagación se realizó en el laboratorio de la Universidad Nacional de Cajamarca – Filial Jaén, en cuatro fases consistentes en: desinfección con hipoclorito de sodio al 2 % con variación del tiempos de 10, 15, 20, y 25 min; establecimiento, elección del mejor medio basal entre Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962), Gamborg B5 (Gamborg,1968) y Woody Plant Medium WPM (Lloyd y McCown 1980); multiplicación, se seleccionó el mejor medio y se aplicó diferentes concentraciones de fitohormonas 1, 2.5, 5 mg/l (BAP) y 1.5 mg/l (BAP) + 1.5 mg/l (Kin); enraizamiento, mejor medio más auxinas en concentraciones diferentes 0.5, 1, 2 mg/l de (AIB) y 0.75 mg/l (AIB) + 0.75 mg/l (ANA).

Como resultado se obtuvo que para la fase de desinfección se debe emplear hipoclorito de sodio al 2 % por 25 min para lograr el 96 % de explantes limpios, en la fase de establecimiento el mejor medio fue Murashige & Skoog 1962 (4.7 g/l) con un crecimiento promedio de 18.8 mm en 30-50 días, mientras que en la fase de multiplicación aplicando fitohormonas a razón de 2.5 mg/l de BAP (citoquininas) es la mejor dosis para conseguir 2.08 brotes en promedio frente a las otras dosificaciones. En la fase de enraizamiento aplicando al mejor medio 2 mg/l de AIB (auxinas), se logró 7.54 mm de longitud mayor frente a las demás dosis. Finalmente se concluye que la micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth fue exitosa y servirá como base para otras investigaciones relacionadas a este tema.

Palabras clave: Micropropagación, chusquines, explantes, *Guadua angustifolia* Kunth, cultivo *in vitro*.

SUMMARY

This investigation was based on defining the best conditions of in vitro culture of *Guadua Angustifolia* Kunth to systematize the massive micro propagation of the best specimens and as a result a micropropagation protocol was defined.

The samples (chusquines), were grown in nursery to finally extract nodal segments with a yolk to proceed to micropropagate them. The micropropagation was carried out in the laboratory of the National University of Cajamarca - Jaén Subsidiary, in four phases consisting of: disinfection with 2% sodium hypochlorite with time variation of 10, 15, 20, and 25 min; establishment, choice of the best baseline medium between Murashige & Skoog (Murashige & Skoog, 1962), Gamborg B5 (Gamborg, 1968) and Woody Plant Medium WPM (Lloyd and McCown 1980); multiplication, the best medium was selected and different concentrations were applied of phytohormones 1, 2.5, 5 mg / l (BAP) and 1.5 mg / l (BAP) + 1.5 mg / l (Kin); rooting, better medium plus auxins in different concentrations 0.5, 1, 2 mg / l of (AIB) and 0.75 mg / l (AIB) + 0.75 mg / l (ANA).

As a result, it was obtained that for the disinfection phase 25 min of 2 % sodium hypochlorite should be used to achieve 96 % of clean explants, in the establishment phase the best medium was Murashige & Skoog 1962 (4.7 g / l) with an average growth of 18.8 mm in 30-50 days, while in the multiplication phase applying phytohormones at a rate of 2.5 mg / l of BAP (cytokinins) is the best dose to get 2.08 outbreaks on average compared to the other dosajes. In the rooting phase, applying 2 mg / l of AIB (auxins) to the best medium, 7.54 mm of greater length was achieved compared to the other doses. Finally, it is concluded that the micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth was successful and will serve as the basis for other research related to this topic.

Keywords: Micropropagation, chusquines, explants, *Guadua angustifolia* Kunth, in vitro culture.

I. INTRODUCCIÓN

La especie *Guadua angustifolia* Kunth conocida comúnmente como guadua, es el bambú tropical económicamente más importante. Esta especie se extiende en América del Sur hacia el norte, hasta los Andes venezolanos y hacia el sur hasta la frontera entre Ecuador y Perú (Judziewicz et al. 1999, citado por Muralanda et al. 2005).

La *Guadua angustifolia* kunth, comúnmente conocida como “caña de Guayaquil” y “caña de bambú”, crece abundantemente en Ecuador y Perú, y también crece rápidamente, alcanzando una altura de 30 metros. Cumple una importante función ecológica en ambos países y se considera una especie de bambú especialmente útil para los servicios ambientales y económicos (INBAR 2018). Es considerado uno de los bambúes de América más apropiados para la fabricación del papel, es utilizado para la fabricación de muebles, objetos decorativos, instrumentos y edificaciones en bahareque (Posso 2011)

La guadua es una planta que aporta múltiples beneficios para el medio ambiente y el hombre, sus productos cuando son empleados como elementos integrales de la construcción de viviendas funcionan como reguladores térmicos y de acústica, el rápido crecimiento de la guadua permite producir y aportar al suelo entre 2 y 4 ton/ha/año de biomasa, volumen que varía según el grado de intervención del guadual; esta biomasa constituye entre el 10 y el 14% de la totalidad de material vegetal que se genera en un guadual. La biomasa es importante, ya que contribuye a enriquecer y mejorar la textura y estructura del suelo. El aporte anual de biomasa general de un guadual en pleno desarrollo oscila entre 30 y 35 ton/ha/año (Giraldo y Sabogal 1999)

La micropropagación es un término que se usa para describir un proceso de cultivo de tejidos vegetales, el cual es ampliamente utilizado para la propagación vegetativa *in vitro* de plantas (Loyola 2006, citado por Galindo 2015). Es la técnica utilizada para la propagación masiva de plántulas a partir de fragmentos de tejidos, pequeñas estacas en un rango de 1-2 cm o más, para el cultivo aséptico y el saneamiento. Este método permite la multiplicación de

plántulas diferenciadas e idénticas a partir de una planta madre, garantizando la conservación de las características que posea (Hernández 1997, citado por Galindo 2015)

La mayoría de reportes conocidos sobre la micropropagación de bambúes se refieren a especies asiáticas, en ellos se han desarrollado diferentes métodos para la propagación a gran escala con fines principalmente comerciales. (Muralanda et al. 2005).

En las regiones de Cajamarca y Amazonas el Estado está promoviendo la reforestación con caña Guayaquil, y desde hace un tiempo el área de plantaciones existente de caña Guayaquil se ha incrementado significativamente a 1000 hectáreas (GOREA 2016). Pero no se ha logrado uniformizar la calidad de la especie, es por ello que la micropropagación constituye una alternativa viable para la propagación del bambú, y la importancia de lograr un protocolo para la propagación de la misma, debido a que la mayoría de protocolos son en especies asiáticas (García et al. 2007)

Ya que el problema de esta especie no es su propagación a gran escala sino mantener su calidad genética, en esta investigación se utilizó la técnica de cultivo in vitro con el objetivo de realizar la micropropagación de *Guadua angustifolia* kunth y proponer un protocolo de micropropagación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

En el seminario – taller avances en la investigación sobre guadua en Pereira, cuyo tema fue la biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la guadua, se desarrolló un método de propagación *in vitro* de *Guadua angustifolia* utilizando yemas axilares, se evaluaron dos métodos de desinfección, se estudió la influencia de la posición de las yemas en la brotación, se evaluaron dos concentraciones de citoquininas; se obtuvieron plantas bien desarrolladas y vigorosas que fueron aclimatadas en el vivero. Se utilizaron los marcadores moleculares para determinar las relaciones genéticas entre accesiones y biotipos de Guadua y se compararon con otras especies presentes en Colombia. El análisis permitió diferenciar entre las especies estudiadas (Muralanda et al. 2002)

En el trabajo titulado “Efectos diferentes de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth, cuyo objetivo es determinar el efecto de distintos métodos de desinfección en el establecimiento y crecimiento *in vitro* de Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth). Para el desarrollo del trabajo se utilizaron dos métodos de desinfección: uno simple basado en el uso de hipoclorito de sodio al 1.0 %, 2.0 % y 3.0 % durante 20 minutos, y uno doble en el cual se utilizó Hipoclorito de sodio al 2.0 % a 5, 10 y 15 minutos con repetición de la desinfección a las 24 horas. Al cabo de una, dos y tres semanas se evaluaron las siguientes variables: porcentaje de contaminación, fenolización, muerte y brotación, número y longitud de los brotes por explante. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación de medias de mínima diferencia significativa. Los resultados demostraron que el método de desinfección doble basado en la utilización de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 minutos con repeticiones a las 24 horas fue el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* kunth (Borges et al. 2004)

En el trabajo de investigación: Micropropagación de *Guadua angustifolia* kunth, realizado en la Universidad Tecnológica de Pereira – Colombia; obtuvo plantas a partir de chusquines de *Guadua angustifolia* Kunth mediante regeneración *in vitro* de yemas axilares. En la fase de desinfección, se evaluaron el bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) y el hipoclorito de sodio ($NaClO$) con distintos tiempos de aplicación. El medio de cultivo en el que se presentaron mejores respuestas estaba compuesto por las sales y vitaminas MS suplementado con 2,5 mg/l de 6BAP, 10 mg/l de mioinositol, 30 g/l de sacarosa y gelificados con 2,5 g/l gelrite. A la cuarta semana de cultivo se evaluó el número de yemas contaminadas por hongos y bacterias, así como el número final de yemas establecidas y la influencia de la edad fisiológica de las yemas. En la micropropagación de *G. angustifolia*, se lograron además resultados en embriogénesis somática. Se obtuvieron callos proembriogénicos a partir de yemas axilares en un medio suplementado con 6 mg/l de 2 -4D. Los callos obtenidos fueron transferidos a medios sin auxinas donde se obtuvo la aparición de estructuras embriogénicas. Los resultados obtenidos sugieren la presencia de un proceso de regeneración vía embriogénesis somática en *G. angustifolia*, el cual no ha sido descrito hasta el momento (Muralanda et al. 2005)

En el establecimiento del cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* presenta como principal inconveniente la contaminación por microorganismos, causando pérdidas biológicas y económicas. Esta investigación fue desarrollada en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua, en Córdoba, Quindío y financiada por la corporación Autónoma Regional del Quindío (C.R.Q). Se evaluaron seis tratamientos para la desinfección de los explantes de guadua con hipoclorito de sodio ($NaClO$) en concentraciones del 2 % y 3 %, cada uno en tiempos de aplicación de 5, 10 y 15 minutos, posteriormente los explantes fueron sembrados en el medio de cultivo Murashige & Skoog, suplementado con 6-BAP a razón de 3 mg. L⁻¹. También se valoró el porcentaje de brotación. El mejor resultado de desinfección y de brotación se obtuvo con el $NaClO$ al 2 % durante 15 minutos (Ramírez 2013).

En la investigación “Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*; poaceae), tuvo como objetivo evaluar el efecto de los medios de cultivo MS, ½ MS, B5 y WPM sobre la propagación *in vitro* de plantas de bambú (*Guadua angustifolia* Kunth). Se utilizó un diseño completamente al azar. Las variables evaluadas fueron: oxidación, brotación, número de brotes por yema brotada, altura de brotes, costos del proceso. Se encontró que empleando un antioxidante (ácido cítrico) en el medio de cultivo MS se redujo hasta el 7 % de oxidación en las yemas. Se manifestó que el medio B5 es el único incapaz de promover brotación; y no existió diferencia para los otros medios de cultivo. Para el número de brotes por yema brotada el medio que promovió mayor número fue el MS, con 2.6 %, seguido del ½ MS que alcanzó el 1.7 %, el WPM el 1.3 % y el B5 el 0 %. En las plantas propagadas la altura de los brotes no presentó diferencia en los cuatro medios, por lo que cualquiera de estos es capaz de estimular la elongación de plantas, mientras que el medio B5 no tiene influencia positiva en su desarrollo. Según los resultados del análisis de los costos del proceso, el costo total de la producción de una plántula de bambú *in vitro* y establecida en invernadero es US \$ 0.18 ó Q 1.40, mientras que el costo a nivel de vivero es US \$ 0.39 ó Q 20.00, a esto se suma la calidad que impacta directamente en la planta propagada (Galindo 2015).

2.2. DESCRIPCION DE LA ESPECIE

2.2.1. *Guadua angustifolia* Kunth

Guadua angustifolia Kunth ha reportado incrementos de altura de 21 cm por día, alcanzando su altura máxima (15 – 30 m) en los primeros 6 meses de crecimiento y su madurez entre los 4 y 5 años. Este crecimiento difícilmente es superado por especies nativas maderables. La composición ideal de culmos en un gradual se ha estimado en 10 % renuevos, 30 % jóvenes, 60 % maduros y sobre maduros, y 0 % seco, con una densidad de 3000 a 8000 culmos por hectárea, presentándose una relación inversa entre densidad y diámetro promedio. La productividad por hectárea de esta especie es de 1.200 –

1.350 culmos/ha/año. Las fases de desarrollo de un tallo o culmo de bambú se pueden resumir en cuatro: brotes o renuevos, culmos jóvenes o verdes, culmos maduros y culmos secos y se estima que ciclo de vida de un tallo esta entre 4 y 7 años (Botero 2004)

2.2.2. Clasificación taxonómica

- **Según el sistema de clasificación de Arthur Cronquist (1981)**

Clase	: Liliopsida Cronquist, Takht. & Zimmerm.
Subclase	: Commelinidae Takht.
Orden	: Cyperales G. T. Burnett
Familia	: Poaceae Barnhart
Género	: Guadua
Especie	: <i>Guadua angustifolia</i> Kunth

- **Según el sistema de clasificación APG IV**

Clase	: Equisetopsida C. Agardh.
Subclase	: Magnolidae Novák ex Takht.
Orden	: Poales Small
Familia	: Poaceae Barnhart
Género	: Guadua Kunth
Especie	: <i>Guadua angustifolia</i> Kunth (Byng et al. 2016)

Descripción

- **Rizoma** paquimorfo, con apariencia de lagarto. Rizoma en si con longitud de 20 – 40 cm, ancho de 20 cm, cuello del rizoma 17 a 20 cm longitud, los entrenudos de la parte superior de rizoma presentan una mayor longitud que los de la parte más basal del rizoma; desarrolla 3 a 4 soportes de rizomas por cada lado, con diámetros de caña 5 cm; presenta raíces adventicias cilíndricas en

la parte alta y frontal del rizoma, y en la parte lateral, son de color café rojizo a pajizo, pueden medir hasta 2.5 m de longitud y 0.3 – 0.4 cm de diámetro.

- **Culmo** 15-20 m de altura, 10-15 cm diámetro, de color verde con rayas verdes más oscura cuando joven, luego se torna verde amarillento a verde grisáceo con la edad, erecto en la base y arqueado apicalmente; entrenudos huecos, con longitudes entre 10-23 cm en los primeros 10 entrenudos, y entre 20 -34 cm en el 1/3 medio y apical, espesor de la pared del culmo 2 cm; nudo solitario, línea nodal pronunciada, horizontal, a veces ligeramente inclinada por debajo de la yema, con banda de pelos blancos, adpresos, arriba y de la línea nodal: banda superior 0.7 – 0.8 cm, banda inferior 1.2 – 1.4 cm, yema solitaria, triangular, protegida por un profilo agudo hacia el ápice, glabrescente, con las alas pubescentes, cubiertas por pelos adpresos de color café claro y marginalmente ciliadas.
- **Hoja caulinar** coriácea, de color café-rojizo, deciduas, sin embargo permanecen más tiempo adheridas sobre el culmo en la porción más basal; lamina de 1/5 parte del tamaño de la vaina; vaina 55 - 77 cm longitud, 65 – 72 cm ancho, abaxialmente hispida, cubierta por dos tipos de pubescencia: a) pelos cortos, tomentosos y, b) pelos hispidos, rigidos, cafes, removibles; adaxialmente glabra brillante; márgenes conspicuos, resaltados por una línea de color negro, ciliados, cilias de color café oscuro; lamina 11 – 15 cm longitud, 14 – 15 cm ancho, triangular, erecta, persistente, ligeramente abombada, mucronada en el ápice, abaxialmente menos pubescente que la vaina, a veces glabra, adaxialmente nervada y pubescente entre las nervaduras, las márgenes ciliadas, con pelos cafés oscuros, deciduos, lígula interna 2 -3 mm longitud, recta o ligeramente inclinada hacia un lado, se extiende de margen a margen, pubescente, cubierta por pelos adpresos de color café.

- **Ramificación** intravaginal; rama primaria solitaria y con espinas, desarrolla 1 – 3 espinas por nudo; el culmo en el 1/3 basal puede desarrollar 0 – 2 ramas con espinas, sin embargo siempre se observa la presencia de una yema en cada nudo la cual se desarrolla en una espina solitaria, gruesa, ahusada y muy puntuda, en el 1/3 medio no desarrollo ramas con follaje sin embargo siempre se observa la presencia de una yema en cada nudo la cual se desarrolla en una espina solitaria, gruesa, ahusada y muy puntuda, en el 1/3 superior desarrollan las ramas con follaje, las cuales pueden tener una longitud de caña 2.7 metros.
- **Hojas del follaje** con lámina linear lanceolada, con ausencia de aurículas y fimbrias en el summit de la vaina (Londoño 2010)
- **Yemas:** se encuentra ubicada en cada nudo, de forma alternada. Tienen la capacidad de producir ramas o raíces (Díaz et al. 2017).

2.2.3. Distribución de la *Guadua angustifolia* Kunth

Guadua angustifolia Kunth es la especie más representativa e importante por sus excelentes características constructivas. Se le encuentra en estado nativo en Colombia, Venezuela y Ecuador, se han identificado zonas naturales de *Guadua angustifolia* Kunth al nor-este del Perú, zonas limítrofes con Ecuador y Colombia. También existen algunas pequeñas áreas plantadas en Tumbes, Piura, Lambayeque, Selva Central, San Martín y sur de Lima (Gonzales 2005)

- **Ecología:** La *Guadua angustifolia* Kunth. crece desde el nivel del mar hasta los 2 600 ms.n.m. Su rango óptimo de altitud está entre los 600 ms.n.m. (clima cálido) y los 2 000 m s.n.m. Las zonas de vida donde esta especie puede establecerse son: el Bosque muy humedo Tropical (bmh-T), Bosque seco Tropical (bs-T), Bosque muy húmedo SubTropical (bmh-ST) y Bosque muy húmedo Montano Bajo (bmh-MB) (Castaño y Moreno 2004, citado por Corrales 2017).

- **Clima:** La guadua tiene un óptimo de temperaturas entre los 20 y los 26 °C, con variaciones que pueden estar por debajo de los 11 y los 36 °C. Requiere precipitaciones entre los 1.300 y 4.000 mm, con buena distribución a lo largo de todos los meses del año y humedad relativa del 80%. La luminosidad para un excelente desarrollo de la guadua debe estar comprendida entre 1800 y 2000 horas/luz/año, aproximadamente de 5 a 6 horas/luz/día (Pérez 2006).

La precipitación es el factor clima que más afecta el desarrollo y crecimiento de la Guadua, es así, como en sitios secos o muy húmedos, se encontrarán los guaduales con las características de desarrollo más deficientes. A su vez la distribución de la precipitación a lo largo del año, influye en el comportamiento general de la especie (Botero 2004)

- **Suelo:** Los suelos franco arcillosos y con buen drenaje son los más aconsejados para este cultivo, aunque también se encuentran en lechos húmedos de cursos de agua y suelos arenosos (MINAG 2008). La humedad del suelo se encuentra estrechamente correlacionada con el desarrollo de la especie. En suelos muy pesados y arcillosos, no crece muy bien la planta (Botero 2004)

2.2.4. Crecimiento y desarrollo de la *Guadua angustifolia* Kunth

Pueden crecer como plantas aisladas dentro del bosque, entre la diversidad de árboles, o a la orilla de ríos. También formar grandes “manchales” e incluso bosques de bambúes (Olivier 2008, citado por Corrales 2017).

Guadua angustifolia Kunth ha reportado incrementos de altura de 21 cm por día, alcanzando su altura máxima (15 – 30 m) en los primeros 6 meses de crecimiento, y su madurez entre los 4 y 5 años, estando lista para ser utilizada y, si se maneja adecuadamente, una vez establecida, puede ser productiva ilimitadamente. Por lo general, el ciclo de crecimiento de un bambú constituye una tercera parte del ciclo

de un árbol de rápido crecimiento, y su productividad por hectárea es dos veces la del árbol. Además, los bambúes emergen del suelo con su diámetro establecido, sin presentar incrementos en diámetros con el tiempo como sucede con los arboles (Botero 2004).

Propagación y producción

Los bambúes se propagan por semilla botánica o vegetativa, dependiendo de la especie y estado de desarrollo de la planta madre, siendo más rápido su propagación por semilla vegetativa, es decir por plántulas que se desarrollan de tallos enterrados, ramas, porciones de rizomas (principalmente las especies monopodiales) y por los denominados “chusquines” (vocablo colombiano), que son plántulas que se desarrollan cerca de la planta madre, en períodos de estrés hídrico, que posteriormente son propagados vegetativamente. Este es el método más eficiente para las especies simpodiales, como es el caso de la *Guadua angustifolia* kunth (MINAG 2008).

2.2.5. Usos de *Guadua angustifolia* Kunth

Utilizan los culmos en construcción, como vigas de techo, para elaborar entresijos con plancha de concreto, para hacer paredes, construir viveros; en forma de latas la utilizan para la construcción de cercos, paredes de bahareque, cerramientos; en forma de esterilla para construir corrales para animales menores (Londoño 2010). Se puede utilizar como sustituto de la madera ya que se puede obtener todo tipo de madera laminada y aglomerada (Botero 2004)

2.2.6. Importancia de *Guadua angustifolia* Kunth

El bambú más que por su importancia económica y social, es cada vez más reconocido por las ventajas y aportes que brinda al ambiente. Cumple un rol ecológico muy importante por la cantidad y calidad de servicios ecosistémicos que aporta a nivel de suelo, aire, agua, microclima, biodiversidad y paisaje (Añazco y Rojas 2015).

La guadua aporta múltiples beneficios para el medio ambiente y el hombre, sus productos cuando son empleados como elementos integrales de la construcción de viviendas funcionan como reguladores térmicos y de acústica, el rápido crecimiento de la guadua permite según el “estudio aportes de biomasa aérea realizado en el Centro Nacional para el estudio del Bambú-Guadua, producir y aportar al suelo entre 2 y 4 ton/ha/año de biomasa, volumen que varía según el grado de intervención del guadual; esta biomasa constituye entre el 10 y el 14% de la totalidad de material vegetal que se genera en un guadual. La biomasa es importante, ya que contribuye a enriquecer y mejorar la textura y estructura del suelo (Giraldo y Sabogal 1999).

Guadua angustifolia kunth es una alternativa real como sustituto de la madera y, al igual que de otros bambúes, de ella se podría obtener industrialmente todo tipo de madera laminada y aglomerada (columnas, vigas, viguetas, cuartones, tablas, paneles, etc.) (Botero 2004)

2.3. MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación constituye la principal aplicación comercial del cultivo de tejidos vegetales. Consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas del cultivo de tejidos, las cuales son muy útiles en los programas de mejoramiento genético, ya que tienen el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial. Por medio de esta técnica es posible obtener un sinnúmero de plantas generalmente homogéneas a partir de ejemplares seleccionados (plantas de elite) (Cedrés et al. 2015). Las técnicas de cultivo in vitro han sido utilizadas de forma extensiva en la propagación y conservación de recursos fitogenéticos en agricultura. De igual manera estas técnicas han sido adaptadas para su utilización en un amplio rango de especies silvestres con problemas de propagación por métodos convencionales y/o con poblaciones extremadamente reducidas (Dodds, citado por Jácome 2011).

Las técnicas del cultivo in vitro tienen los siguientes usos: a) mejoramiento genético; b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; c) conservación de germoplasma; y d) micropropagación (Villalobos y Thorpe1991).

2.3.1. Fases de la Micropropagación

Se ha propuesto tres pasos o fases fundamentales para propagar eficientemente una especie: 1) el establecimiento aséptico del cultivo; 2) su multiplicación; y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante al suelo (Murashige 1974, citado por Villalobos y Thorpe 1991)

- **Fase 1:** Establecimiento del cultivo. El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de novo) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos. La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos. La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantes con agua corriente, el empleo de etanol al 70 % por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5 % de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y

actividad. Posteriormente, los explantes deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril.

- **Fase 2:** Multiplicación. El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica. Es importante señalar que cualquiera sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes.
- **Fase 3:** Enraizamiento y aclimatización. En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones in vitro como ex vitro. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{4}$ de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2 %. Medios con baja concentración salina, como el WPM (Lloyd & McCown 1981) y GD (Gresshoff & Doy 1972) incrementan el porcentaje de

enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas. El empleo de agar presenta ventajas y desventajas sobre la rizogénesis. Por un lado, el enraizamiento de especies forestales en agar se favorecería al producirse una rizogénesis más sincrónica como resultado del contacto íntimo de las estacas con el medio de cultivo. Sin embargo, las raíces producidas por este método son usualmente engrosadas y no poseen pelos radiculares. Adicionalmente, el empleo de agar está asociado con la formación de callo en la base de las estacas, que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos (Levitus 2010)

Factores que influyen en la micropropagación: Los factores que influyen drásticamente en la micropropagación son: el explante, la planta donadora, la composición de los medios de cultivo y los factores físicos (luz y temperatura), a continuación se detallan estos factores (Roca y Mroginski 1991).

- **El explante:** la elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está dirigida por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Wampash et al. 2011).

El explante es una parte del tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta para ser cultivado en condiciones in vitro, sobre un medio de cultivo. Los explantes pueden provenir de raíces, hojas, meristemos vegetativos o reproductivos, semillas, tallos, ápices, yemas axilares, tejido ovular, anteras, granos de polen, etc. En la mayoría de los casos, la micropropagación se lleva a cabo utilizando yemas o meristemos caulinares como material de partida. Los meristemos tienen la ventaja de ser un material muy estable desde un punto de vista genético y de encontrarse normalmente libre de virus. No obstante, a menudo resulta difícil su utilización debido a que su manipulación es más compleja a

consecuencia de su reducido tamaño (0,2 - 1,0 mm) y al largo período de tiempo requerido para el desarrollo de los tallos. Debido a ello es más frecuente la utilización de explantes caulinares constituidos por el meristemo apical y uno o más nudos, debido a que son más fáciles de manipular, se establecen rápidamente y a menudo proliferan bien. Las yemas axilares a partir de brotes epicórmicos se generan a partir de yemas latentes y se caracterizan por tener un crecimiento vigoroso alcanzando grandes dimensiones en relativo poco tiempo. Se ha observado que la edad fisiológica de los explantes tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado este el tejido que se va a cultivar, mejor será la respuesta in vitro (Roca y Mroginski 1991).

- **La planta donadora o planta madre.** Las plantas madres de las cuales se toman los primeros explantes deben ser sanas y poseer características varietales conformes con la variedad elegida. En poco tiempo se obtendrá un elevado número de plantas sanas genéticamente iguales a la planta madre (Hartmann et al. 1997, citado por Jácome 2011). Se ha observado que los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas (Styer 1983, citado por Jácome 2011)
- **Composición de los medios de cultivo.** La composición de los medios de cultivo utilizados, en cada caso, variará de acuerdo a los requerimientos de las diferentes especies y a las condiciones particulares de cada laboratorio, no siempre fácilmente reproducibles. La experiencia indica que son múltiples las variables que inciden en el cultivo. Por tanto, el origen y edad de las explantes, presencia de contaminantes y respuesta a los diferentes medios, son puntos importantes a solucionar para la iniciación del cultivo. Lograr el ajuste de la técnica implica obtener brotes homogéneos para enraizar y plantas adaptadas capaces

de sobrevivir a las condiciones ambientales naturales. A la mayoría de los medios de cultivo se les adiciona compuestos denominados fitohormonas o también llamados hormonas vegetales. Estas son sustancias químicas producidas por algunas células vegetales en sitios estratégicos de la planta y estas hormonas son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas (Roca y Mroginski 1991).

Las fitohormonas se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales, a diferencia de las hormonas animales, sintetizadas en glándulas. Pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos xilemáticos y floemáticos. Las hormonas vegetales controlan un gran número de sucesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias fitohormonas. Se establecen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones vegetales, lo que permite solucionar el problema de la ausencia de sistema nervioso. Las fitohormonas ejercen sus efectos mediante complejos mecanismos moleculares, que desembocan en cambios de la expresión génica, cambios en el citoesqueleto, regulación de las vías metabólicas y cambio de flujos iónicos (Garnica 2005, citado por Jácome 2011).

La adición de estas fitohormonas al medio en diferentes proporciones puede estimular o detener el crecimiento o diferenciación de algunos órganos de la planta. Por eso con la utilización de éstos, en diferentes concentraciones y la mezcla de varios, se puede manipular algunos procesos morfo genéticos de la planta. Los principales reguladores de crecimiento son: auxinas, citoquininas, giberelinas (GA3), ácido abscísico (ABA). (Rojas 2003, citado por Jácome 2011)

Factores físicos: Los factores físicos que influyen de forma significativa en la micropropagación son: la luz y la temperatura. La temperatura de incubación para la propagación de la mayoría de las familias fluctúa entre 24 y 28 °C (Roca y Mroginski 1991). Los efectos de la luz proporcionada a los explantes se pueden dividir en términos de intensidad, largo del día y calidad. Las plantas necesitan luz para regular ciertos procesos morfogénicos como formación del tallo, inducción radicular o embriogénesis somática (Dubo 2006).

2.3.2. Medios de cultivo

Medios de cultivo un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias. Los microorganismos son los seres más abundantes de la tierra, pueden vivir en condiciones extremas de pH, temperatura y tensión de oxígeno, colonizando una amplia diversidad de nichos ecológicos. Entre los requerimientos más importantes para su desarrollo están el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno. Muchas bacterias sin embargo necesitan del aporte extra de factores de crecimiento específicos en forma de suero, sangre y extracto de levadura entre otros (López y Torres 2006).

2.3.3. Hormonas y reguladores de crecimiento

En algunos casos se obtiene en los cultivos in vitro las respuestas deseadas mediante el empleo del MB (medio basal) sin reguladores de crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los casos se hace necesario agregar a los medios sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citosinas (Wampash et al. 2011).

Las hormonas reguladoras del crecimiento son de los compuestos más importantes que influyen en un medio de cultivo. Los reguladores de crecimiento se dividen en auxinas, citosinas, giberelinas y retardante o inhibidores del crecimiento. Son naturales (hormonas) o sintéticas (reguladores de crecimiento) (Cedrés et al. 2015).

- **Auxinas:** Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, enraizamiento y otros. En cultivo in vitro las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: AIB (ácido indol-3-butírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El AIB y el ANA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos. Las auxinas se disuelven usualmente en etanol diluido o en una solución de hidróxido de sodio. Las auxinas son el grupo más conocido de fitorreguladores o fitohormonas que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; aunque también se ha encontrado que al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Rojas 2003, citado por Jácome 2017).

Pueden intervenir factores distintos, como los vinculados con la nutrición (en los tejidos caulinares son muy importantes los hidratos de carbono y las sustancias nitrogenadas). Inhibe el desarrollo de las yemas axiales, dando origen una dominancia apical (Roca y Mroginski 1991). Las auxinas más usadas en la práctica son el ácido indol butírico (AIB), ácido indo acético (AIA), ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido α -naftalén acético (ANA). En la práctica, el uso de las auxinas es un arte. Generalmente solo se utiliza una auxina cada vez. Sin embargo, para algunos investigadores ocasionalmente ha sido útil el uso simultáneo de dos auxinas en una misma fórmula del medio de cultivo. Ya que varias auxinas parecen tener diferentes sitios de acción, en ciertos casos podría ser conveniente ensayarlas (Roca y Mroginski 1991).

- **Citoquininas.** Las citoquininas, a débil concentración, se utilizan frecuentemente para estimular la proliferación de tejidos en los cultivos. A concentraciones más elevadas favorecen la formación de nuevas yemas sobre callos. Finalmente, pueden utilizarse a concentraciones muy fuertes para favorecer la proliferación in vitro de meristemas axilares en cultivo de ápices y para permitir la obtención de macollos de yemas (Margara, citado por Dubo 2006).

Entre las citoquininas más usadas se encuentran la benzilaminopurina (BAP), dimetilalilaminopurina (2iP), kinetina (KIN) y zeatina (ZEA) en concentraciones comprendidas entre 0,01- 3 mg/L, según el tipo de desarrollo que se desee inducir (Murashige, citado por Dubo 2006).

Citocininas están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo in vitro se incorporan citoquininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citoquininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), kinetina zeatina y 2-ip (isopentenil-adenina). Generalmente son diluidas con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio (Becerra 2001)

- **Giberelinas.** Las Giberelinas (GAs) son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos esenciales del crecimiento y el desarrollo en los vegetales superiores. Los efectos más evidentes se observan en la estimulación del crecimiento del tallo, la inducción del desarrollo del fruto y la germinación de las semillas (Cerezo 2017).

2.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.

La micropropagación vegetal constituye dentro de las biotecnologías, la técnica que mayor aporte práctico ha brindado. Sus aplicaciones van desde los estudios teóricos de fisiología y bioquímica vegetal, hasta la obtención de plantas libres de patógenos, la propagación masiva, la conservación de germoplasma, la producción de metabolitos secundarios, el mejoramiento genético mediante la inducción de mutaciones y la selección in vitro (Pérez, citado por Ramírez 2013)

Las ventajas potenciales del uso de sistemas de cultivo in vitro pueden ser enormes, entre los que se encuentran: Las altas tasas de multiplicación que se consiguen, La de ser un cultivo aséptico que puede mantenerse libre de hongos, bacterias, virus e insectos El espacio reducido que ocupan La economía frente a colecciones de campo Las múltiples aplicaciones en programas de mejora genética. Sin embargo, las técnicas de micropropagación no están exentas de problemas (Iriando, citado por Jácome 2011).

La micropropagación a escala comercial posee características particulares que podrían crear problemas y por ende limitan su uso. Estas desventajas se pueden resumir como: Requerimiento de costoso y sofisticado material de trabajo; entrenamiento del personal y especialización técnica.; alto costo inicial de las labores; la contaminación puede causar altas pérdidas en corto tiempo; se requiere un volumen alto, más o menos continuo en el sistema de distribución de materiales e insumos (Hartmann y Kester, citado por Dubo 2006).

2.5. COSTOS DE PRODUCCIÓN DE BAMBÚ MICROPROPAGADO

Costos de producción (Q) por planta de bambú producida en laboratorio y adaptada en invernadero (con base en una producción estimada de 1000000 de plantas) (Galindo 2015)

Descripción	Costos Laboratorio (Q)	Costo Invernadero (Q)	Total (Q)	%
Costo fijo y variable	0.47	0.13	0.60	42.78
Mano de obra		0.01	0.31	
Energía eléctrica	0.30			22.13
Depreciación de equipo	0.04	-	0.04	2.95
Depreciación biofabrica	0.04	-	0.04	2.56
Depreciación invernadero	-	0.01	0.01	0.52
Sustrato	-	0.06	0.06	4.15
Depreciación bandejas	-	0.03	0.03	2.12
Reactivos	0.04	-	0.04	2.92
agroquímicos	-	0.16	0.16	11.41
Materiales varios	0.04	0.05	0.09	6.15
Papelería, útiles y accesorios	0.01	0.00	0.01	0.75
Otros servicios	0.01	0.00	0.01	0.85
Imprevistos	0.01	0.00	0.01	0.46
Viáticos	0.00	-	0.00	0.24
Total de costo de producción (Q)	0.96	0.45	1.40	100.00
Total USD \$	\$ 0.123	\$ 0.058	\$ 0.181	

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

3.1.1. Ubicación

La investigación se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad Nacional de Cajamarca – Filial Jaén del distrito de Jaén, provincia de Jaén, del departamento de Cajamarca.

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por brotes denominados localmente como chusquines (colectados del distrito de Aramango, provincia de Bagua, Departamento de Amazonas), los cuales se conservarán en un vivero acondicionado para tal fin, de estos brotes se obtendrán los explantes constituidos por yemas.

3.2.2. Reactivos.

Constituyentes de los medios basales de: murashige y skoog (1962), Gamborg (B5 – 1968) y WPM (Lloyd y McCown 1980); Reguladores de crecimiento: N6- Bencil aminopurina (BAP), kinetina (Kin), Ácido naftalen acético (ANA) y Ácido inbol butírico (AIB); Agar agar; sacarosa (azúcar); Hipoclorito de sodio (NaClO); Agua destilada esteril; Alcohol al 70 %; Tween 80 (detergente).

3.2.3. Material y equipo de laboratorio.

- **Materiales de vidrio**

Tubos de ensayo de 25 mm x 150 mm; placas Petri; balones de 1000 ml; beaker de 500 ml y 100 ml; pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml; fiolas de 100, 250, 500 y 1000 ml; frascos para reactivos; embudo; bagueta; Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml; probetas de 10, 25, 50, 100 y 250 ml; mechero de alcohol.

- **Equipos**

Dosificador de medios, temporizador, refrigeradora, pH-metro, estereoscopio, autoclave, agitador magnético, cámara de flujo laminar, balanza analítica, equipos fluorescentes de 40 w, estufa, destilador de agua.

- **Otros**

Papel aluminio, hojas de bisturí, papel parafilm, algodón, lapiceros marcadores, libreta de apunte, materiales de escritorio, gradillas.

3.3. METODOLOGÍA

La micropropagación vegetativa in vitro de *Guadua angustifolia* kunth se realizó en un ambiente de la Universidad Nacional de Cajamarca – Filial Jaén, condicionado específicamente para la investigación, en la provincia de Jaén, región Cajamarca. La metodología se basó en obtener el mejor tratamiento para lograr la micropropagación de *Guadua angustifolia* kunth, cuyo proceso de investigación se llevó a cabo en dos etapas.

- **Primera etapa:** trabajo de campo y de laboratorio, que se dividen en preparación del explante en vivero y micropropagación que consta de 5 fases: fase de preparación de medios de cultivo, fase de desinfección, fase de establecimiento, fase de multiplicación y fase de enraizamiento.
- **Segunda etapa:** La etapa final de gabinete corresponderá al análisis de la información para la formulación del protocolo de micropropagación in vitro de *Guadua angustifolia* kunth.

3.3.1 Fase de campo y laboratorio

En esta fase se trabajó 2 etapas, la primera a nivel de vivero y la segunda a nivel de laboratorio (micropropagación *in vitro*).

A. Preparación del explante

Se colectaron chusquines y estacas (del distrito de Aramango, provincia de Bagua, Departamento de Amazonas) los cuales fueron repicados en bolsas (con un sustrato compuesto por humus y suelo de bosque desinfectados con agua caliente), estas fueron trasladadas a un vivero en el cual se estimuló el crecimiento y la mayor formación de yemas mediante la aplicación de abonos foliares, y antes de extraer los fragmentos de las plántulas de las que se obtienen los explantes (yemas), estas recibieron tratamientos con sustancias fungicidas para disminuir la contaminación.

B. Micropropagación *In vitro*

- **Fase de preparación de medios de cultivo**

Se mezcló medios de cultivo, reguladores de crecimiento (para la fase de multiplicación y enraizamiento), sacarosa, según cantidades indicadas por los autores y de acuerdo a los diferentes tratamientos en estudio dentro de cada fase, luego se midió el pH de los medios; luego se calentó la solución preparada y se agregó el Agar agar para lograr la disolución de la sustancia, el medio Murashige & Skoog (MS) 1962 se preparó 4.7 g/l de MS más 28 g/l de sacarosa (azúcar) y 14 g/l de Agar agar, el medio Gamborg (B5 – 1968) se preparó con 3.10 g/l del medio más las mismas concentraciones de sacarosa (azúcar) y Agar agar utilizadas para el medio anterior, de igual forma para el medio WPM (Lloyd y McCown 1980) cuya concentración de medio fue de 2.47 g/l más las mismas

cantidades de sacarosa (azúcar) y Agar agar utilizadas anteriormente; luego de la preparación, los medios de cultivo se distribuyeron en volúmenes de 10 ml a los tubos de ensayo, cubriendo la boca del tubo con papel aluminio, en seguida se procedió a esterilizar el medio de cultivo en un autoclave a 121 °C y una presión de 1.3 kg/cm², durante 20 minutos, manteniéndolo en un lugar estéril hasta su uso.

- **Fase de desinfección**

Consistió en la eliminación de los microorganismos contaminantes presentes en la superficie del explante, para de esta forma lograr la esterilidad que es indispensable en los cultivos in vitro.

Esta fase se llevó a cabo de la siguiente manera: de los chusquines establecidos en el vivero se seleccionaron ramas jóvenes con yemas bien definidas, las cuales fueron cortadas y llevadas al laboratorio en donde se realizó un lavado con abundante agua y 1 gota de detergente líquido Tween (20 a 30 minutos). Las yemas (segmentos nodales de 8 a 12 mm con una yema) fueron individualizadas y lavadas con abundante agua. Posteriormente se realizó una pre-desinfección con etanol al 70 % durante un minuto y se colocaron para la desinfección en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % más 2 gotas de Tween (detergente) durante 10, 15, 20 y 25 minutos, una vez transcurrido estos tiempos, las yemas fueron lavadas con agua destilada estéril dentro de la cabina de flujo laminar.

Luego de la desinfección las yemas (segmentos nodales de 8 a 12 mm con una yema) fueron colocadas en placa Petri esterilizadas, las cuales fueron repicadas a tubos de ensayo que contenían el medio de cultivo, que fueron llevados al cuarto de cultivo

Para cada tratamiento se empleó 24 explantes (tabla 1). Registrándose el número y porcentaje de explantes sanos y sin contaminación después de 30 días, teniendo en cuenta la turbiedad del medio de cultivo y la presencia de microorganismos contaminantes.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección aplicados

Tratamientos	Desinfectantes	Tiempo de exposición /minutos)	Nº de Explantes
T1	Hipoclorito de sodio al 2 %	10	24
T2	Hipoclorito de sodio al 2 %	15	24
T3	Hipoclorito de sodio al 2 %	20	24
T4	Hipoclorito de sodio al 2 %	25	24

- **Fase de establecimiento.**

Para esta fase se utilizaron el tratamiento que dio mejor resultado en la fase anterior para desinfectar los explantes (tratamiento 4), los mismos que fueron repicados a tubos de ensayo contenidos en medios de cultivo en estudio (tabla 2). Se colocó un explante por tubo.

Los tubos colocados en gradillas se mantuvieron en el cuarto de cultivo en un periodo de 60 días y se evaluó que medio era el mejor para el establecimiento o mejor crecimiento de la especie cuya evaluación consistió en la medición longitudinal del explante.

Tabla 2: Tratamientos para la fase de establecimiento

Tratamientos	Medios de cultivo	Nº de explantes
T1	Murashige y skoog(1962)	24
T2	Gamborg (B5 – 1968)	24
T3	WPM(Lloyd y McCown 1980)	24

- **Fase de multiplicación**

Cuando los explantes de la fase anterior lograron crecer significativamente fueron llevados a la cámara de flujo laminar, donde una vez extraídas y expuestas en una placa Petri esterilizada, el tallo fue cortado en segmentos, con 2 a 3 pares de yemas axilares. Luego se procedió a sembrar colocando un segmento por tubo que contenía el mejor medio escogido de la fase anterior (Murashige & Skoog) y suplementado con 6-BAP en diferentes proporciones según tratamientos (tabla 3).

Finalmente los tubos conteniendo las microestacas fueron llevados a un cuarto de cultivo por un periodo de 45 días y se evaluó que tratamiento dio mejor resultado con respecto a la multiplicación de la especie, evaluándose número de brotes por explante.

Tabla 3. Tratamientos para la fase de multiplicación

Tratamiento	Medios de cultivo	Nº de Explantes
T1	*MM + 1mg/l de BAP	24
T2	*MM+ 2.5 mg/l de BAP	24
T3	*MM + 5mg/l de BAP	24
T4	*MM + 1.5 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de kin	24

***MM= Mejor medio obtenido en la fase de establecimiento**

- **Fase de enraizamiento**

Esta fase se inició cuando las yemas producidas de la fase anterior alcanzaron 1.0 cm de longitud en promedio, las cuales fueron aisladas e incubados en cámaras de cultivo con iluminación artificial (2.000 lux, 12 horas luz). Para inducir el enraizamiento de los brotes, éstos fueron transferidos a un medio cultivo (Murashige & Skoog) en concentraciones de macronutrientes diluidas al 50 % y se les agrego los reguladores de crecimiento, AIB y ANA en concentración según los tratamientos a ensayados (tabla 4), se repicaron 24 yemas por tratamiento estudiado; las cuales fueron incubadas en un cuarto de cultivo por un periodo de 30 días, transcurrido este tiempo se intenta observar la formación de primordios radiculares.

Luego los explantes fueron cambiados a otros tubos que contenía el mismo medio pero sin reguladores de crecimiento para la expresión del enraizamiento. Evaluándose la longitud promedio de la raíz mayor por explante.

Tabla 4. Tratamientos para la fase de enraizamiento.

Tratamientos	Medios de cultivo	Nº de Explantes
T1	MM. + 0.5 mg/l de AIB	24
T2	MM + 1 mg/l de AIB	24
T3	MM. +2 mg/l de AIB	24
T4	MM. + 0.75 mg/l de ANA + 0.75 mg/l de AIB	24

***MM = Mejor medio obtenido en la fase de establecimiento**

3.3.2. Fase final de gabinete

Los resultados obtenidos en las diferentes fases de la micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth, fueron recogidos en formatos adecuados para tal fin. Estos datos fueron ordenados y tabulados para su procesamiento estadístico correspondiente.

De cada fase, se obtuvo los estadísticos de tendencia central y dispersión, para elaborar las tablas y gráficas correspondientes; así mismo se realizó un análisis de varianza ANVA para comprobar la superioridad estadística de algún tratamiento, y la prueba de significación estadística de TUKEY para determinar el tratamiento sobresaliente por cada fase.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS DE LA FASE DE DESINFECCIÓN

Tabla 5. Porcentaje de explantes no contaminados

- Explantes no contaminados de *Guadua angustifolia* Kunth por tratamiento.

Nº	Tratamientos	Tiempo de exposición/ minutos	Nº explantes	Nº de explantes no contaminados	% de explantes no contaminados
1	T1	10	24	2	8 %
2	T2	15	24	5	21 %
3	T3	20	24	19	79 %
4	T4	25	24	23	96 %

C.V. = 84.15 %

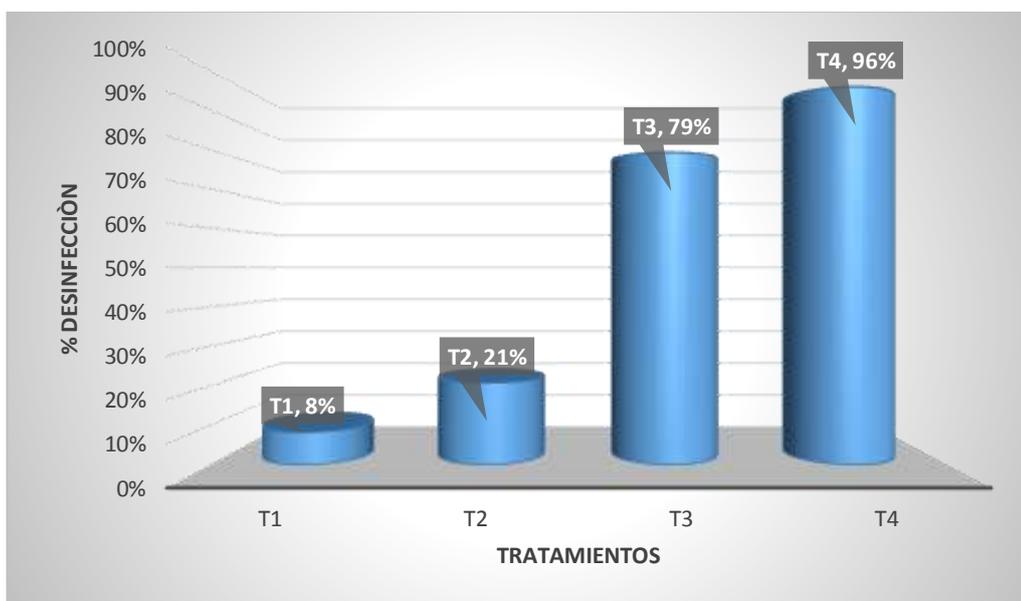


Gráfico 1. Porcentaje de explantes de *Guadua angustifolia* Kunth no contaminados por tratamiento.

En la tabla 5 y el gráfico 1 procesados de la tabla 15 (anexo 2) se muestran los resultados de los tratamientos realizados en la desinfección de explantes de *Guadua angustifolia* Kunth, con un coeficiente de variación (C.V.) de 84.15 % que indica que existe heterogeneidad en los tratamientos y por ende mayor variación, determinándose según la tabla que el tratamiento 4 (T4) presenta el 96 % de explantes no contaminados, lo cual indica que a una exposición de 25 minutos de los segmentos nodales en hipoclorito de sodio al 2 % se logra mayor porcentaje de explantes libres de contaminación, en conclusión este tratamiento es el más óptimo en desinfección de explantes

Estos resultados coinciden con los señalados por García et al. (2007) en su investigación “Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata*” en donde demuestra que fue posible establecer *in vitro* yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var. *Vittata* con altos porcentajes de yemas establecidas (86.6 - 100 %) al emplear hipoclorito de sodio al 2.0 % durante 20 minutos para la desinfección; obteniendo 93.7 % de explantes libres de contaminantes microbianos visibles a partir de yemas axilares introducidas en condiciones *in vitro*. Resultados diferentes obtuvo Ramírez (2015) en su investigación “Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo *in vitro*” concluye que el tratamiento con el cual se logró la mejor desinfección y brotación de los segmentos nodales de *Guadua angustifolia* se obtuvo con la aplicación del NaClO al 2 % durante 15 minutos.

Sin embargo Borges et al. 2004, difiere de los resultados en su investigación “Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth” utilizando dos métodos de desinfección: uno simple basado en el uso de hipoclorito de sodio al 1.0 %, 2.0 % y 3.0 % durante 20 minutos, y uno doble en el cual se utilizó hipoclorito de sodio al 2.0 % a 5, 10 y 15 minutos con repetición de la desinfección a las 24 horas. Obteniendo como resultado que el método de desinfección doble basado en la utilización de hipoclorito de sodio al 2 % durante 5 minutos con repetición a las 24 horas resultó el más adecuado para el establecimiento *in vitro* de explantes primarios de *Guadua angustifolia* Kunth.

4.2. FASE DE ESTABLECIMIENTO

Tabla 6. Media por tratamientos

- Evaluación del crecimiento promedio

Nº	Tratamientos	Medios de cultivo	Crecimiento promedio (mm)
1	T1	M&S	18.08
2	T2	GAMBORG	11.33
3	T3	WPM	11.00

C.V. = 23.0935 %.

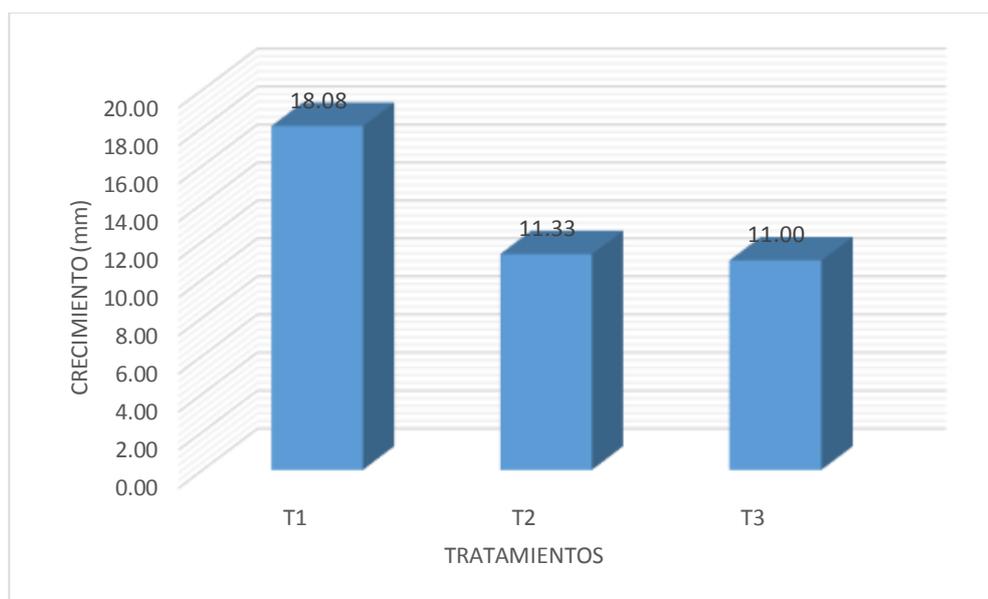


Gráfico 2. Promedio de crecimiento de explantes de *Guadua angustifolia* Kunth por tratamiento.

En la tabla 6 y gráfico 2, se puede observar la media o crecimiento promedio por cada tratamiento, donde se puede ver que el tratamiento 1 (medio de cultivo Murashige & Skoog- 1962) es superior a los otros dos tratamientos, en relación a la altura promedio del explante sin la aplicación de hormonas, con 18.08 milímetros entre 30 a 50 días.

Esto debido a los componentes del medio (anexo 5). Así mismo su coeficiente de variación (C.V.) es de 23.0935 % lo cual indica que el crecimiento promedio es homogéneo, existiendo mayor variación en el tratamiento 1.

Tabla 7. Análisis de varianza de la fase de establecimiento

Análisis de la fase de establecimiento desglosado de la tabla 17 (anexo 3) procesado de la tabla 16 (anexo 3); que procesa el crecimiento promedio por tratamiento (medio de cultivo) para encontrar el mejor medio de cultivo.

Análisis ANVA

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2	766.7778	383.3889	17.9571	0.0000005266	3.12964
Dentro de los grupos	69	1473.1667	21.3502			
Total	71	2239.9444				

$\alpha = 95 \%$

Tabla 8. Prueba de significancia TUKEY para la fase de establecimiento.

Resultado del tabla 18 (anexo 3)

Tratamiento	Grupo estadístico
T1	A
T2 y T3	B

Según el análisis de varianza (tabla 7), indica que el valor de F (calculada) es mayor que el valor crítico de F (tabular), con una probabilidad de 0.0000005266 lo que demuestro que existió diferencia estadística significativa para la variable crecimiento promedio, con base en estos resultados, se realizó la prueba Tukey (tabla 8) para determinar el mejor tratamiento lo cual dio como resultado, que existe diferencia estadística entre los tratamientos 1 y 2, 1 y 3, y no hay diferencia estadística entre 2 y 3, concluyendo que el tratamiento 1 (aplicación de medio de cultivo Murashige & skoog 1962) es el mejor tratamiento, ya que el medio Murashige & Skoog 1962 tiene una proporción adecuada tanto de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas y aminoácidos para el desarrollo de *Guadua angustifolia* Kunth. Estos resultados coinciden con lo señalado por Muralanda et al. (2002) en el cual usa como único medio de cultivo Murashie skoog 1962 logrando 73.6 % de yemas establecidas.

Se afirman los resultados con Jiménez et al. (2006) en su investigación “In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation” utiliza como medio de cultivo el medio basal de sales minerales Murashige & Skoog 1962, obteniendo 3 cm. de crecimiento para el día 50.

Además Malajovich (2015) en su guía 111 – Micropropagación: medios de cultivo clásicos, corrobora los resultados describiendo que de acuerdo con el fabricante (Sigma), el medio basal de Murashige & Skoog que contiene los macro y micronutrientes de la fórmula clásica original, puede ser complementado con vitaminas, sacarosa, agar, auxinas (IAA) y citocininas de modo que genere un medio completo para el crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales. Además en su guía 96 – Micropropagación: medios de cultivo, afirma que uno de los medios más utilizados es el de Murashige & Skoog (M&S), una mezcla compleja de sales complementada con vitaminas, a la cual se agrega sacarosa y agar. Por ser bastante concentrado, a veces se usa en una dilución del 50 %.

4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

Tabla 9. Promedio de número de brotes por tratamiento

Nº	Tratamientos	Medio de cultivo	Nº explantes	Promedio número de brotes
1	T1	*MM + 1mg/l de BAP	24	1.29
2	T2	*MM+ 2.5 mg/l de BAP	24	2.08
3	T3	*MM + 5mg/l de BAP	24	1.58
4	T4	*MM + 1.5 mg/l de BAP + 1.5 mg/l de kin	24	1.21

C.V. = 33.36778 %

*MM = mejor medio.

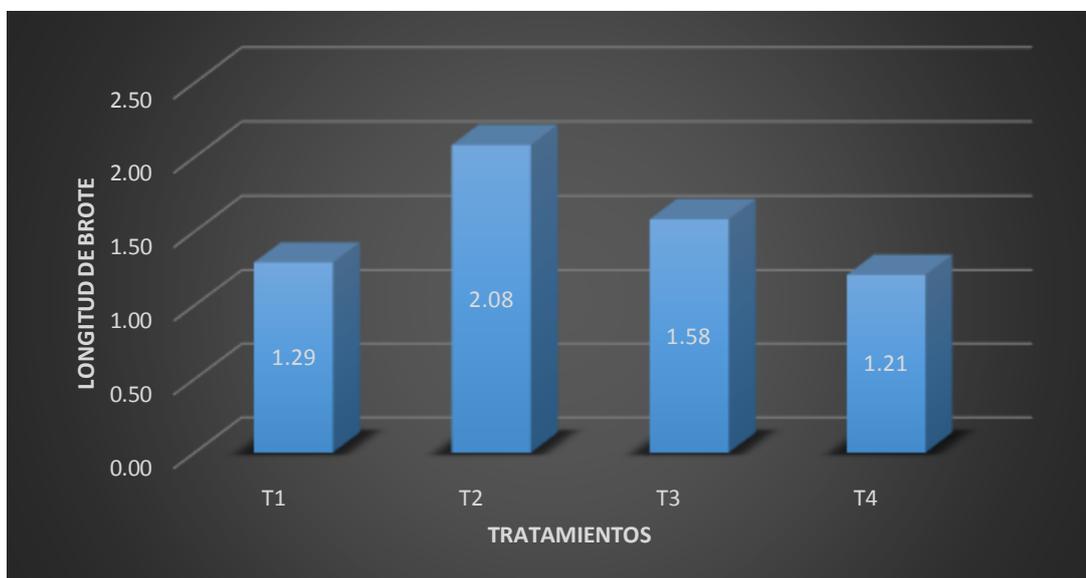


Gráfico 3. Número promedio de brotes de explantes de *Guadua angustifolia* Kunth por tratamiento .

En la tabla 9 y el gráfico 3, se puede observar el resultado de la multiplicación de los explantes de *Guadua angustifolia* Kunth, donde el tratamiento 2 (*MM + 2.5mg/l de BAP) produjo los mejores resultados en número de brotes por explante con un promedio de 2.08 brotes; y el coeficiente de variación (C.V.) es de 33.3678 % indicando que existe homogeneidad en el promedio de número de brotes, con una ligera diferencia para el tratamiento 2.

Tabla 10. Análisis de varianza de la fase de multiplicación

Análisis de la fase de multiplicación desglosado de la tabla 20 (anexo 4) y procesado de la tabla 19 (anexo 4)

Análisis ANVA

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico de F
Entre grupos	3	11.25	3.75	14.0339	0.0000001312	2.7036
Dentro de los grupos	92	24.5833	0.2672			
Total	95	35.83333				

$\alpha = 95 \%$

Tabla 11. Prueba de significancia TUKEY de la fase de multiplicación

- Resumen de la tabla 21 (anexo 4)

Tratamiento	Grupo estadístico
T2	A
T1, T3 y T4	B

Según el análisis de varianza de la tabla 10 se puede observar que F (calculada) es mayor que el valor crítico de F (tabular) cuya probabilidad es de 0.0000001312 menor que α (0.05) lo cual indica que existe diferencia estadística significativa para la variable promedio de número de brotes por tratamiento, para la cual se realizó la prueba Tukey (tabla 11) que determinó el mejor tratamiento, cuyo resultado demuestra que hay diferencia estadística entre los tratamientos 1 y 2, 2 y 3, 2 y 4, y no hay diferencia estadística entre 1 y 3, 1 y 4, 3 y 4; lo cual indica que el tratamiento dos es diferente a los demás tratamientos y por ende es el mejor tratamiento logrando un porcentaje promedio de brotes mayor al de los demás, debido a que la cantidad de citosinas utilizadas fue la más óptima.

Los resultados concuerdan con los descritos por Muraland et al. (2005), donde los brotes obtenidos fueron multiplicados en medio MS con 2,5 mg/l de 6-BAP, realizándose subcultivos cada cuatro semanas. Los brotes multiplicados eran de aspecto vigoroso y con buen desarrollo vegetativo (2 a 4 hojas); Así la tasa de multiplicación fue de 2 explantes por explante original.

De la misma manera Jimenez et al. (2006) en su investigación "In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation", utilizando BAP más medio de cultivo Murashige & Skoog, con la diferencia que la concentración utilizada fue de 3mg de BAP en medio de cultivo Murashige & Skoog observó brotación y su brote más alto, habiendo trabajado con hasta 5 mg de BAP y después de 6 subcultivos, obtuvieron de 8 – 12 ejes, y una división en grupos de 3 – 5 ejes permitiendo la multiplicación de las plantas

De igual forma Galindo (2015) en su investigación "Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*; Poaceae)" obtuvo como resultado que los tratamientos $\frac{1}{2}$ MS, MS y WPM formaron un mismo grupo estadístico, aunque el número de brotes tienden a ser superiores en el medio Murashige & Skoog más una concentración de 0.1 mg/l de 6 BAP, obteniendo 2.6 brotes por explante.

4.4. FASE DE ENRAIZAMIENTO

Tabla 12. Promedio de longitud de raíz mayor

Nº	Tratamientos	Medio de cultivo	Nº explantes	Promedio de longitud de raíz mayor (mm)
1	T1	MM. + 0.5 mg/l de AIB	24	0.33
2	T2	MM + 1 mg/l de AIB	24	4.69
3	T3	MM. +2 mg/l de AIB	24	7.54
4	T4	MM. + 0.75 mg/l de ANA + 0.75 mg/l de AIB	24	5.67

C.V. =98.7887 %

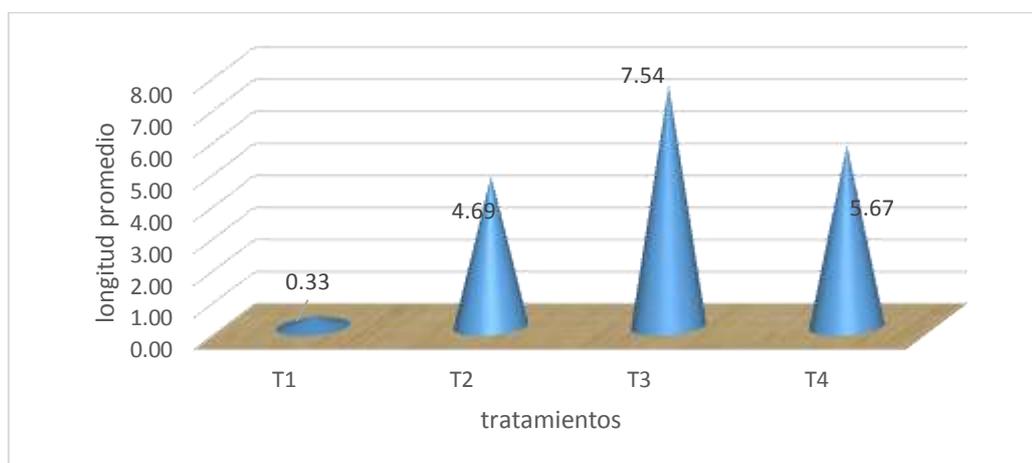


Gráfico 4. Porcentaje de longitud de raíz mayor de explantes de *Guadua angustifolia* Kunth por tratamiento .

En la tabla 12 y gráfico 4, se describe que el tratamiento 3 (T3) obtuvo mejores resultados con un promedio de longitud de raíz mayor a 7.54 milímetros, con un coeficiente de variación (C.V.) de 98.7887 que indica que existe heterogeneidad entre los tratamientos, siendo el tratamiento 3 superior a los otros tratamientos.

Tabla 13. Análisis de varianza de la fase de enraizamiento

Análisis de la fase de enraizamiento, desglosado de la tabla 22 (anexo 4)
y procesado de la tabla 23 (anexo 4)

Análisis ANVA

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor critico de F
Entre grupos	2	100.9653	50.4826	10.2692	0.000124727	3.1296
Dentro de los grupos	69	339.1979	4.9159			
Total	71	440.1632				

$\alpha = 95 \%$

Tabla 14. Prueba de significancia Tukey para la fase de enraizamiento
Resumen del tabla 24 (anexo 4)

Tratamiento	Grupo estadístico
T3	A
T2 y T4	B
T1	C

Mediante análisis de varianza (tabla 13) aplicado a los datos de crecimiento promedio de raíz mayor, se observa que el valor de F (calculado) fue mayor que el valor crítico de F (tabular) con una probabilidad de 0.000124727 menor que α , lo que demostró que existe diferencia estadística entre los tratamientos, por lo cual se realizó la prueba Tukey (tabla 14) la cual determinó el mejor tratamiento, indicando que hay diferencia estadística entre los tratamientos 1 y 2, 1 y 3, 1 y 4, 2 y 3, 3 y 4; y no hay diferencia estadística entre 2 y 4, concluyendo que el tratamiento 3 es el mejor y más significativo, corroborado con su promedio representativo de la longitud de raíz mayor, ya que este tratamiento logro un promedio de raíz mayor debido a la concentración de auxinas. Los resultados de esta fase fueron favorables bajo el tratamiento que contenía medio de cultivo Murashige Skoog 1962 más 2mg/l de AIB.

Según Nadgir et al. Citado por Garcia (2011), menciona que el enraizamiento *in vitro* en bambúes constituye una limitante para la propagación *in vitro* de bambúes. Pero concluye diciendo que para inducir al enraizamiento *in vitro*, la auxina más empleada ha sido el ácido indol - 3 - butírico (AIB), utilizado en muchas especies de bambú; lo cual coincide con lo utilizado para la fase de enraizamiento dentro de esta investigación.

Muralanda et al. (2005) utiliza para esta fase el medio de cultivo MS con 1mg/l de AIA. En estas condiciones el 90 % de las plántulas enraizaron y alcanzaron altura entre 7 y 10 cm. Igualmente la elongación y enraizamiento de las plantas es fácilmente inducible al eliminarse las citoquininas del medio de cultivo y adicionar concentraciones bajas de una auxina suave como el AIA. Siendo los resultados obtenidos similares a esta investigación pero con una auxina diferente.

4.5. PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN

Protocolo base para la micropropagación in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth en Jaén, Cajamarca”

Especie:

Nombre científico : *Guadua angustifolia* Kunth

Nombre común : Guayaquil, bambú.

a) Explante utilizado

Segmentos nodales de 8 a 12 milímetros que contengan una yema.

- b) Desinfección del explante:** lavar los explantes con abundante agua y 1 gotas de detergente líquido Tween (20 a 30 minutos). Posteriormente realizar una pre-desinfección con etanol al 70 % durante un minuto, seguidamente enjuagar con agua destilada esterilizada y colocar en la solución de hipoclorito de sodio al 2 % más 2 gotas de Tween durante 25 minutos para luego enjuagar con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar (5 veces) y sembrar en medios de cultivo para evaluar el porcentaje de contaminación.

Sub cultivo: la incubación debe tener una duración de 35 días, con un registro de explantes sanos después de 30 días.

- c) Fase de establecimiento:** Los explantes una vez desinfectados se colocan en el medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (4.7 g/l) para la obtención de plantas completas, adicionando como fuente de carbono azúcar (28 g/l), como agente gelificante Agar-agar (14 g/l) Este medio es colocado en tubos de ensayo (10 ml/tubo), ajustado el pH a 6 y se esterilizan en autoclave a 121 °C, durante 30 minutos.

Sub cultivo: la incubación debe tener una duración de 60 días, con observaciones cada semana, si pasada la 4 semana no se obtiene crecimiento se debe pasar a un medio fresco.

- d) Fase de multiplicación:** se coloca en el medio de cultivo Murashege & Skoog 1962, empleándose como tratamiento fitohormonas BAP (bencilamino purina) a una concentración de 2.5 mg/l. Este medio es colocado en tubos de ensayo (10 ml/tubo), ajustado el pH a 6 y se esterilizan en autoclave a 121 °C, durante 30 minutos.

Sub cultivo: la incubación debe tener una duración de 45 días, con observaciones cada semana.

e) Enraizamiento

Una vez obtenidos los brotes se subcultivan en un medio de enraizamiento, el cual contiene el mismo medio de cultivo (Murashige & Skoog 1962) más fitohormona AIB (ácido indol butírico) en concentración de 2 mg/l.

Sub cultivo: la incubación debe tener una duración de 30 días, con toma de datos al día final, para ser trasplantada aun medio sin reguladores de crecimiento.

Condiciones de incubación (para todas las fases): temperatura 28 °C a una exposición de luz de 14 horas y 10 horas de oscuridad.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en se trabajó la presente investigación y de acuerdo a los resultados obtenidos se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1. El proceso de desinfección adecuado para la especie *Guadua angustifolia* kunth en su micropropagación in vitro es usar hipoclorito de sodio al 2 % durante 25 minutos ya que se obtuvieron mejores resultados de desinfección del explante.
2. El mejor medio de cultivo identificado para este trabajo de investigación de micropropagación de *Guadua angustifolia* kunth, corresponde al medio Murashige & Skoog 1962.
3. El mejor resultado en la multiplicación de *Guadua angustifolia* Kunth se logró con la aplicación de 2.5 PPM de BAP (Bencilamino Purina) en un medio de MS 1962, así como para la fase de enraizamiento el regulador de crecimiento adecuado corresponde a la concentración de 2 PPM de AIB (ácido Indol butírico)
4. En función a los resultados obtenidos en la investigación se formuló un protocolo de micro propagación de la *Guadua angustifolia* Kunth que se recomienda aplicar.

5.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la investigación de micropropagación de *Guadua angustifolia* Kunth probando otras formulaciones de medios de cultivo y concentraciones de fitohormonas.

Realizar trabajos de investigación hasta la fase de aclimatación, con el objetivo de generar mayor conocimiento y a su vez comprobar la efectividad del protocolo llevado a campo.

Continuar la investigación con la selección de clones sobresalientes de *Guadua angustifolia* Kunth para la conservación de germoplasma ex situ.

VI. LITERATURA CITADA

Añazco, M; Rojas, S. 2015. Estudio de la cadena desde la producción al consumo del bambú en Ecuador con énfasis en la especie *Guadua angustifolia*. Red Internacional del Bambú y el Ratán (INBAR). Quito, Ecuador.

Arbelaez A., Rodrigues S., Hurtado A. 2001. Investigaciones sobre *Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Medellín, Colombia. 92 p. Disponible en: https://www.usmp.edu.pe/centro_bambu_peru/pdf/investigacion_Bambu_colombia.pdf

Becerra M, V. 2001. Micropropagación Vegetativa In Vitro de *Nageia rospigliosii* Pilger. Jaén, Tesis, Universidad Nacional de Cajamarca. Jaén, Perú.

Byng, J; Chase, M; Christenhusz, M; Fay, M; Judd, W; Mabberley, D; Sennikov, A; Soltis, D; Soltis, P; Stevens, P. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/299489625_An_update_of_the_Angiosperm_Phylogeny_Group_classification_for_the_orders_and_families_of_flowering_plants_APG_IV

Borges Garcia, M; Ros Araluce, C; Castellanos Rubio, Y; Milanes Rodriguez, S; Velásquez Feria, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth, Biotecnología Vegetal. Cuba. 4(4): 237 – 242

Botero Cortés, LF. 2004, Manual de Bambú, COMPYMEFOR – apoyo a la mejora de la competitividad de las PYMES del sector forestal Industrial en Argentina. Argentina. Disponible en: <https://cdn.website->

editor.net/a6d5d07bd07b4ebbb41c70f03402e2a8/files/uploaded/manual%2520industrializacion%2520del%2520bamb%25C3%25BA.pdf

Castaño N, F. 1989. Resumen de estudios sobre la *Guadua angustifolia* realizados por parte de la C. V. C. Ponencia presentada al IV Simposio Nacional Bambú / Guadua Inciva, Tlúa, Colombia.

Castaño, F. y Moreno, R. 2004. Guadua para todos. Cultivo y aprovechamiento. Bogotá. 190 p.

Castillo, A. (s.f.). Propagación de platas por cultivo in vitro: Una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Recuperado el 27 de Marzo de 2016. Disponible en: http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf.

Cedrés Gazo, M; Sharry, S; Adema, M; Abedini, W. 2015. Planta de probeta: manual para la propagacion de plantas por cultivo de tejidos in vito. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.

Cerezo M. 2017. Tema X Giberelinas, fisiología vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena. 7 p. Disponible en: <https://georgiusm.files.wordpress.com/2017/11/tema-10-giberelinas.pdf>

Córdova Leiva, PM. 2012. Evaluación del efecto de los ciclos de cultivo y reguladores de crecimiento sobre la estabilidad genética en el cultivo de segmentos nodales de *Chinchona officinalis* usando marcadores ISSR. Tesis previa a la obtencion del titulo de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular De Loja. Ecuador. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/3011/3/C%C3%B3rdova%20Leiva%20Pa%C3%BA%20Marcelo.pdf>

Corrales H. 2017. Establecimiento in vitro del bambú *Guadua angustifolia* Kunth bajo seis tratamientos de desinfección aplicados en segmentos nodales procedentes de ramas primarias. Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

Cronquist, A. 1981. An integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. Nueva York.

Daquinta Gradaile, M; Pacheco Rodriguez, D; Lezcano Más, Y; Sagarra Torrijo, F. 2010, Propagación *in vitro* de bambú chino (*Dracaena sanderiana* L). Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila. Artículo en Ciencia y Tecnología. Cuba. 3(1): 7 – 13.

Díaz Flores, Y; Mendoza Cienfuegos, E; Inga Santillan, C. 2017, Manual técnico del Bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) Para productores, Universidad de Sassari – fundación AVSI, Amazonas, Perú.

Dubo Cárdenas, RG. 2006. Establecimiento *in vitro* de diferentes especies y genotipos de género *Rhododendron* mediante el uso de técnicas de micropropagación. Valdivia, Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/fad817e/doc/fad817e.pdf>

Galindo Guzmán, DAS. 2015. Evaluación de medios de cultivo para la propagación *in-vitro* de bambú (*Guadua angustifolia*; poaceae), tesis de grado. Universidad Rafael Landívar. La Democracia - Escuintla, Guatemala. 48 p.

García Ramírez, Y; Freire Seijo, M; Fajardo, L; Tejeda, M; Reyes, M. 2007, Establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *Vittata*, Biotecnología Vegetal 7(3): 155 – 159. Consultado 5 ene 2017. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/373/html>

García Ramírez, Y; Freire Seijo, M; Hurtado, O. 2011. Propagación *in vitro* de bambúes. Biotecnología Vegetal 11(3): 131 -142. Consultado 8 may 2019. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/237/831>

Giraldo Herrera, E; Sabogal Ospina, A. 1999, *LA GUADUA una alternativa sostenible*, publicación de la corporación autónoma regional del Quindío, CRQ. Quindío. 42 p.

Gonzales Mora, HE. 2005. Elaboración de una propuesta para el aprovechamiento y la transformación del bambú en el ámbito del PRODAPP (Puerto Inca – Oxapampa), Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

GOREA (Gobierno Regional de Amazonas). 2016. Zonificación Ecológica y Económica del Departamento de Amazonas. Instituto de investigación de la Amazonía Peruana (IIAP). 1era edición. Lima, Perú. Disponible en: <http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/PUBL520.pdf>

Gutierrez Tejeda, GR. 2015. Caracterización de los productos obtenidos por destilación seca de bambú (*Guadua angustifolia* Kunth) procedente del distrito de la Florida, San Miguel, Cajamarca. Tesis para optar el título de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2123/K50-G88-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hurtado, DV; Merino, ME. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Edición 1. Mexico. Editorial Trillas. 232 p.

INBAR (Red Internacional del Bambú y el Ratán) 2018 - 2019. Bambu sostenible para Ecuador y Perú. Ecuador y Perú. Disponible en: <https://www.inbar.int/es/project/sustainablebamboolac/>

Jacome Tabango, AS. 2011, Micropropagación *in vitro* de la especie emdémica: Jigueron (*Aegiphila ferruginea*), para la producción masiva y conservación de esta especie en peligro de extinción, tesis de pregrado, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolqui, Ecuador. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3238/1/T-ESPE-031075.pdf>

Jáquez, F. 1990: Guía técnica para el fomento del bambú en cuencas hidrográficas. Instituto Nacional de Recursos Hidricos y Universidad Autonoma de Santo Domingo. República Dominicana.

Jiménez, VM; Castillo, J; Tavares, E; Guevara, E; Montiel, M. 2006. In vitro propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica.

López Tévez, L; Torres, C., 2006. Trabajo práctico N° 4 - medios de cultivo; microbiología general, facultad de agroindustrias - Universidad Nacional del Nordeste. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

Londoño, X. 2010, Identificación Taxonómica de los Bambúes de la Región Noroccidental del Perú. Ministerio de Agricultura. Dirección General forestal y de Fauna Silvestre. Perú. p. 21–22. Disponible en: http://www.itto.int/files/user/pdf/PROJECT_REPORTS/INFORME%20TAXONOMIA%20BAMB%C3%9A.pdf

Malajovich, M. 2015, Guías de actividades, Biotecnología: enseñanza y divulgación. Rio de Janeiro, Brasil. Disponible en: https://bteduc.com/es_guias.html

Marulanda, ML; Carvajalino, M; Vargas C; Londoño, X. 2002. La biotecnología aplicada al estudio y aprovechamiento de la guadua. Seminario - Taller Avances en la investigación sobre Guadua. Pereira, Colombia.

Marulanda, M; Gutiérrez, L; Marquez, MP. 2005. Micropropagación de *Guadua angustifolia* kunth. Trabajo de investigación. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

MINAG (Ministerio de Agricultura). 2008. Plan Nacional de Promoción del Bambú 2008 – 2010. Lima, Perú.

Murashige, T; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-497.

Navarro, L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Instituto Nacional de Investigaciones

Agrarias. Centro de Levanie. Moncada, Valencia. Bol Serv. Plagas 5:127-148. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_plagas%20FBSVP-05-02-127-148.pdf

Pérez, AM. 2006. *Guadua angustifolia* Kunth, 1822. Ficha para la conservación de recursos biológicos. Instituto Alexander von Humboldt. Colombia. Disponible en: <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=280&method=displayAAT>

Posso Terranova, AM. 2011. Diversidad genética y estructura poblacional de *Guadua angustifolia* Kunth en el eje cafetalero colombiano. Universidad Nacional de Colombia. Palmira – Colombia. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo6.pdf>

Ramirez, L. 2013. Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo in vitro (en línea). Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Biotecnología Agraria. Bogotá, COL. Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD. 49 p. Disponible en <https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/1069/2/Tesis%20Final%20mayo%202013.pdf>

Raya Montaña, YA; Carrillo Castañeda, G; Pedraza Santos, ME; Corona Torres, T; Carrillo Salazar JA; Alcantara Gonzales G. 2011. Propagación in vitro de *Laelia halbingeriana*. Revista mexicana de ciencias agrícolas Texcoco 2 n. ° esp. 3:539-553. Consulta 7 set 2018. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000900011

Roca, WM; Mroginski, LA. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT – Centro de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Salas Delgado, E. 2006. Actualidad y futuro de la arquitectura de bambu en Colombia. Simon Velez: Simbolo y búsqueda de lo primitivo. Tesis de doctorado. Universidad Politecnica de Cataluña. Barcelona. Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93442/01_ESD_Portada_sumari.pdf

Vásquez, R; Rojas, RDP. 2016. Clave para identificar grupos de familias de Gymnospermae y Angiospermae del Perú. Jardín Botánico de Missouri. Perú.

Villalobos, VM; Thorpe, TA. 1991. Micropropación: conceptos, metodología y resultados. Capítulo 6 de Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT – Centro de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Wampash Najamtai, GB; Nieves Nieves, GR; Barriga Castillo, FM. 2011. Implementacion, adecuación y valoración de un sistema de climatizado, para el área de incubación del laboratorio de micropropagación del Campus Juan Lunardi Cantón Paute, provincia del Azuay. Cuenca. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1097/12/UPS-CT002122.pdf>

ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Cuadros y pruebas estadísticas de la fase de desinfección.

ANEXO 2. Cuadros y pruebas estadísticas de la de establecimiento.

ANEXO 3. Estadísticos de la fase de multiplicación.

ANEXO 4. Estadísticos de la fase de enraizamiento.

ANEXO 5. Tabla de composición de medios de cultivo.

ANEXO 6. Certificado de identificación Botánica.

ANEXO 7. Panel Fotográfico para las clases de uso de la tierra.

ANEXO 1. Tablas y pruebas estadísticas de la fase de desinfección

Tabla 15. Del procesamiento de datos de la fase de desinfección

Tratamientos	Tiempo de exposición	Nº de explantes	Explantes contaminados	Explantes no contaminados	% de explantes contaminados	% de explantes no contaminados
T1	10	24	22	2	92%	8%
T2	15	24	19	5	79%	21%
T3	20	24	9	19	38%	79%
T4	25	24	1	23	4%	96%

PROMEDIO : 0.51

DESVIACIÓN: 0.43

C. V. : 84.15

ANEXO 2. TABLAS Y PRUEBAS ESTADÍSTICAS DE LA DE ESTABLECIMIENTO

Tabla 16. Datos de la fase de establecimiento

Datos del crecimiento del explante en milímetros, tomados a partir del día 30

Repeticiones	Tratamientos (mm)		
	MS	GAMBORG	WPM
1	18	15	13
2	20	12	10
3	28	12	10
4	31	12	11
5	20	10	10
6	20	11	15
7	11	10	10
8	7	10	10
9	8	10	10
10	18	15	13
11	20	12	10
12	28	12	10
13	31	12	11
14	18	10	10
15	20	11	15
16	11	10	10
17	6	10	10
18	8	10	10
19	20	11	10
20	16	11	12
21	27	12	11
22	26	11	11
23	11	12	10
24	11	11	12
Media	18.0833333	11.3333333	11
Desviación estándar	7.72301285	1.40392824	1.560379

C. V.= 23.0936

Tabla 17. Análisis ANVA completo de la fase de establecimiento.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma de cuadrados	Promedio	Varianza
MS	24	434	18.0833	59.6449
GAMBORG	24	272	11.3333	1.9710
WPM	24	264	11	2.4348

$\alpha = 95\%$

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2	766.7778	383.3889	17.9571	0.0000005266	3.12964
Dentro de los grupos	69	1473.1667	21.3502			
Total	71	2239.9444				

Tabla 18. Prueba de significancia TUKEY (Copenhaver - Holland 1988)

		TRATAMIENTOS		
		A	B	C
TRATAMIENTOS	A		0.00000982	0.00000376
	B	7.157		0.9662
	C	7.51	0.3534	

ANEXO 3. ESTADÍSTICOS DE LA FASE DE MULTIPLICACIÓN

Tabla 19. Datos de la fase de multiplicación

Repeticiones	tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	1	2	1	1
2	1	2	2	1
3	2	3	2	2
4	1	1	1	1
5	1	2	2	1
6	2	3	1	2
7	1	2	2	1
8	1	1	1	1
9	1	2	2	1
10	2	3	2	2
11	2	2	2	1
12	1	2	1	1
13	1	2	2	1
14	2	3	1	2
15	1	2	2	1
16	1	2	1	1
17	1	2	2	1
18	1	1	2	2
19	2	2	1	1
20	1	3	2	1
21	1	2	1	1
22	1	1	2	1
23	1	3	1	1
24	2	2	2	1
Media	1.2917	2.0833	1.5833	1.2083
Desviación estándar	0.4643	0.6539	0.5036	0.4149

C. V. = 33.3678

Tabla 20. Análisis ANVA completo de la fase de multiplicación

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
T1	24	31	1.2916	0.2155
T2	24	50	2.0833	0.4275
T3	24	38	1.5833	0.2536
T4	24	29	1.2083	0.1721

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor critico de F
Entre grupos	3	11.25	3.75	14.0339	0.0000001312	2.7036
Dentro de los grupos	92	24.5833	0.2672			
Total	95	35.83333				

$\alpha = 95\%$

Tabla 21. Prueba TUKEY (Copenhaver - Holland 1988) para la fase de multiplicación

		TRATAMIENTOS			
		A	B	C	D
TRATAMIENTOS	A		0.00000457	0.2129	0.944
	B	7.503		0.006327	0.0000004188
	C	2.764	4.739		0.0645
	D	0.7898	8.293	3.554	

ANEXO 4. ESTADÍSTICOS DE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO

Tabla 22. Datos para la fase de enraizamiento

Repeticiones	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
1	0	3	7	4
2	0	6	9	5
3	0	8	5	5
4	0	3	5	8
5	0	6	7	8
6	0	5	10	8
7	4	2	5	4
8	0	2	13	8
9	0	3.5	7	5
10	0	4	13	4
11	0	2	11	4
12	0	5	5	5
13	2	2	7	8
14	0	6	10	8
15	0	6	6	8
16	0	5	3	5
17	0	6	5	2
18	0	5	7	4
19	0	6	10	5
20	2	5	6	5
21	0	5	11	4
22	0	6	11	5
23	0	6	3	7
24	0	5	5	7
Media	0.3333	4.6875	7.5417	5.6667
Desviación estándar.	0.9631	1.6406	2.9632	1.8098

C. V. = 98.7887

Tabla 23. Análisis ANVA completo para la fase de enraizamiento.

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
T2	24	112.5	4.6875	2.6916
T3	24	181	7.5417	8.7808
T4	24	136	5.6667	3.2754

$\alpha = 95\%$

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor critico de F
Entre grupos	2	100.9653	50.4826	10.2692	0.000124727	3.1296
Dentro de los grupos	69	339.1979	4.9159			
Total	71	440.1632				

Tabla 24. Prueba de significancia TUKEY (Copenhaver - Holland 1988) para la fase de enraizamiento

		TRATAMIENTOS			
		A	B	C	D
TRATAMIENTOS	A		0.0000000006149	0.0000000004823	0.0000000004823
	B	10.78		0.00001644	0.3227
	C	17.84	7.063		0.00784
	D	13.2	2.423	4.64	

ANEXO 5. TABLA DE COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

COMPOSICIÓN	MEDIOS		
Macronutrientes (mg/l)	Gamborg B5 1968	Lloyd &McCown (1981)WPM	Murashige & Skoog 1962
KNO ₃ (Nitrato de potasio)	2500		1900
NH ₄ NO ₃ (Nitrato de amonio)		400	1650
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (Nitrato de calcio tetrahidratado)		556	
CaCl ₂ .2H ₂ O (Cloruro de calcio dihidratado)	150	96	440
MgSO ₄ 7h ₂ O (Sulfato de magnesio heptahidratado)	250	370	370
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potasio monobásico)		170	170
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (Fosfato de sodio hidratado)	150		
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sulfato de amonio)	134		
Micronutrientes (mg/L)	Gamborg B5 1968	Lloyd &McCown (1981)WPM	MURashige & Skoog 1962
MnSO ₄ .4H ₂ O (Sulfato de manganeso tetrahidratado)	H13200	H29430	22300
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de zinc heptahidratado)	2000	8600	8600

H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	3000	6200	6200
KI (Yoduro de potasio)	750		830
CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de cobre pentahidratado)	25	250	25
NaMoO ₄ .2H ₂ O (Molibdato de sodio dihidratado)	250	250	250
CoCl ₂ .6H ₂ O (Cobalto de cloruro hexahidratado)	25		25
FeSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de hierro heptahidratado)	13902	27800	27650
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	18613	37300	37250
Vitaminas (µg/L)	Gamborg B51968	Mullin et al (1974) B	MUrashige & Skoog 1962
Inositol	100mg	100mg	100mg
Thiamine.HCl	10000	1000	100
Nicotinic acid	1000	500	500
Pyridoxine.HCl	1000	500	500
Aminoácidos(mg/L)	None	Skoog 1944	Skoog 1944
Alamine	2.0		
Arginine	2.0		

ANEXO 7. PANEL FOTOGRÁFICO

Figura 1: Guadual donde se colectaron chusquines.



Figura 2: Riego de plantones en vivero (chusquines trasplantados)



Figura 3: Preparación de material para esterilizar.



Figura 4. Material para esterilizar.



Figura 5. Preparación de medio de cultivo.



Figura 6. Medio de cultivo listo para autoclavar.



Figura 7: Desinfección de yemas con hipoclorito de sodio.



Figura 8. Siembra en cámara de flujo laminar.



Figura 9. Muestras en el cuarto de cultivo.



Figura 10. Fase de establecimiento



Figura 11. Fase de establecimiento – crecimiento



Figura 12. Fase Multiplicación (1er brote).



Figura 13. Fase de multiplicacion (2do. brote)



Figura 14. Fase de multiplicacion (brotes)



Figura 15. Fase de enraizamiento



Figura 16. Explante enraizado pasado al medio sin fitohormona, resultado después de varias semanas.

